

细菌脱色酶 TpmD 的酶学特性研究

任随周 郭 俊, 王亚丽, 岑英华, 孙国萍*

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘 要: 从嗜水气单胞菌 DN322 中分离纯化出能够对三苯基甲烷类染料结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿进行高效脱色的脱色酶, 命名为 TpmD。在测定 TpmD 分子量、等电点及对不同三苯基甲烷染料脱色的动力学参数、脱色过程对分子氧及 NADH/NADPH 具有依赖性的基础上, 又进一步从黄素 FAD/FMN 对酶活力的影响、酶抑制剂、酶蛋白 N-末端测序及酶溶液的特征吸收光谱等方面对 TpmD 的酶学本质进行了分析。结果表明, TpmD 不含核黄素, 其脱色活性也不因加入 FAD 或 FMN 而提高。TpmD 的 N-末端氨基酸序列与多种氧化还原酶具有同源性。甲吡酮及维生素 C (Vc) 对 TpmD 的脱色活性具有明显的抑制作用。TpmD 酶蛋白的溶液在 408nm 处有一特征吸收峰, 但在连二亚硫酸钠的还原条件下通入 CO 气体后, 该酶不具有 P450 酶在 450nm 处的特征吸收峰。上述结果显示脱色酶 TpmD 是一种新的氧化酶。

关键词: 脱色酶; 三苯基甲烷类染料; 酶学特性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0823-04

三苯基甲烷染料是仅次于偶氮染料的一大类染料, 在纺织印染、食品、医药、造纸、化妆品及制革等工业及生物组织染色中被广泛地应用^[1]。三苯基甲烷染料对人和动物细胞具有毒害及致突变作用, 是对人类健康具有潜在危害的环境污染物^[2]。随着经济的快速发展, 染料的使用范围及产量日益扩大, 人们对染料引发的人类及环境危害的警觉性也日益提高。最近国内外关于食品中致癌物偶氮染料苏丹红及水产品中三苯基甲烷染料孔雀绿等污染的报道, 更加引起人们对染料安全性的关注^[3, 4]。

生物方法是目前去除染料污染较为有效的方法。将固定化脱色酶应用于含染料废水的脱色及循环利用时, 无需添加供菌体生长的底物, 因而具有美好的应用潜力。目前已有将固定化的偶氮还原酶应用于含偶氮染料的印染废水处理的相关报道^[5]。对于三苯基甲烷类染料, 尽管已有文献报道包括细菌、放线菌和真菌在内的多种微生物对这类染料具有一定的脱色功能^[6-18], 但目前对三苯基甲烷类染料的微生物脱色机理研究仍然很少^[1]。真菌中的 *Phanerochaete chrysosporium* 能够利用其木素过氧化物酶以逐步去甲基化的方式对三苯基甲烷染料结晶紫进行脱色与降解^[6]; *Cunninghamella elegans* 通过细胞中某种未知酶的作用以去甲基化的方式对孔雀绿进行脱色与降解, 且有 P450 系统的参与^[7]。而细菌中催化三苯基甲烷类染料脱色的关键酶(或酶系)到目前为止仍不清楚^[1]。研究细菌中三苯基甲烷类染料脱色酶并探讨其脱色的酶学特性和机制, 不仅可以为利用固

定化脱色酶处理工业废水的工艺设计提供科学参考, 也有望在解决当前水产品孔雀绿污染问题上发挥作用。

前文我们报道了从一株嗜水气单胞菌中分离纯化得到一种三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD, 测定了该酶的分子量、等电点及对不同染料的动力学参数, 并证实该酶催化的脱色过程依赖于分子氧及 NADH/NADPH 的存在^[1]。本文在以上研究的基础上, 又进一步从酶抑制剂、酶蛋白 N-末端测序及酶蛋白溶液的特征吸收光谱等方面对 TpmD 的酶学本质进行了分析。结果显示该脱色酶 TpmD 是一种新的氧化酶。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* subsp.) 菌株 DN322, 见参考文献 [19]。

1.1.2 主要试剂和仪器: 结晶紫、碱性品红、灿烂绿、孔雀绿及甲吡酮为 Sigma 产品, Vc 为国产分析纯。紫外-可见分光光度计 (BECKMAN DV640), Hoefer miniVE 垂直板电泳仪 (Hoefer Pharmacia Biotech Instruments), 超声波破碎仪 (SONICS VC-505, USA), 蛋白质测序仪 (ABI Applied Biosystems 492 cLC Protein Sequencer)。

1.2 酶的纯化及对三苯基甲烷类染料的脱色特性

三苯基甲烷类染料脱色酶 TpmD 的分离纯化及基本酶学性质见参考文献 [19]。

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA 214040); 广东省自然科学基金团队项目(015017); 广东省科技攻关重大项目(2004A3040 4002); 广东省自然科学基金项目(032319)

* 通讯作者。Tel: 86-20-87684471; Fax: 86-20-87684587; E-mail: ebiotech@gdas.ac.cn; guopingsun@163.com

作者简介: 任随周(1974-)男, 河南灵宝人, 博士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: rensz@163.com

收稿日期: 2005-11-07; 接受日期: 2005-12-01; 修回日期: 2006-04-19

1.3 酶活力的测定及活力单位定义

酶活测定在 30℃ 条件下进行,反应总体积为 100 μ L。77 μ L 的 50.0mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)与 15 μ L 的酶混合后加入 5 μ L 5.0mmol/L 的染料(终浓度为 0.25mmol/L)加入 3 μ L 25.0mmol/L 的 NADH(终浓度 0.75mmol/L)后,立即于分光光度计上连续测定染料在最大吸收波长处 OD 值的减少,同时用秒表计时。结晶紫、碱性品红、灿烂绿及孔雀绿的最大吸收波长分别为 590nm、545nm、630nm 和 617nm。以加入灭活(100℃ 30min)酶液的反应混合液为对照,30℃ 每分钟催化 1mmol 染料所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

1.4 蛋白质浓度的测定

参照 Bradford^[20]的方法。

1.5 黄素 FAD 或 FMN 对 TpmD 活力影响的测定

在上述测酶活的反应体系中分别加入 FAD 或 FMN,使其终浓度依次为 2.0、5.0、8.0、10.0mmol/L。以未加 FAD 或 FMN 的反应混合液为对照,分别测定不同浓度的 FAD 或 FMN 对脱色酶活力的影响。

1.6 不同抑制剂对脱色酶活性的影响

在上述 100 μ L 测酶活的反应体系中分别加入不同的抑制剂鱼藤酮、抗霉素 A、NaN₃、Vc 及甲吡酮,使其在反应体系中分别达到一定的终浓度。以未加抑制剂的反应混合液为对照,分别测定不同浓度的抑制剂鱼藤酮、抗霉素 A、NaN₃、Vc 及甲吡酮对脱色酶活力的影响。

1.7 酶蛋白的 N-端测序

将纯化后的浓度为 0.73mg/mL 的脱色酶 TpmD 10 μ L,点样于经过 2h 预电泳的 12% SDS-PAGE 上,经 130V 2h 的电泳后取出凝胶,于 Coomassie R-250 染色 30min,然后在振荡器上用脱色缓冲溶液脱色过夜。小心用刀片从脱色完全的凝胶上将目标条带切下,溶于 7% 乙酸中,由上海基康生物技术公司电转移至 PVDF 膜后在蛋白质测序仪上测定酶蛋白的 N-末端部分序列。

1.8 酶蛋白的特征光谱迁移情况测定

操作方法参照文献[21],取含量为 4.57mg/mL 的纯化酶蛋白待测液 600 μ L,向其中加入 8.0mg 连二亚硫酸钠后,分成两份。静置 5min 后,向其中一份通入 CO 气体(时间 1min)至饱和,记录基线后,在 200nm~800nm 波长范围内对通 CO 气体后的样品进行光谱扫描。未通气的另一管直接在上述波长范围内进行光谱扫描。

为验证测定方法的可靠性,按照文献[21]的方法从小白鼠的肝脏中抽提微粒体后,按照上述方法同时进行测定。

2 结果和分析

2.1 黄素 FAD 或 FMN 对脱色酶活性的影响

在前文测得 TpmD 是 NADH/NADPH 依赖性的氧化酶的基础上^[19],又进一步测定了 FAD 或 FMN 对脱色酶活性的影响情况,结果显示与未加 FAD 或 FMN 的对照相比,2.0~10.0mmol/L 的 FAD 或 FMN 对 TpmD 的活力无明显促进作用。

2.2 不同抑制剂对脱色酶活性的影响

2.2.1 鱼藤酮、抗霉素 A 及 NaN₃ 对脱色酶活性的影响:分别测定了 2.0~10.0mmol/L 的抑制剂鱼藤酮、抗霉素 A 及 NaN₃ 对 TpmD 活力的影响情况,结果显示与未加抑制剂的对照相比,这 3 种抑制剂对 TpmD 的脱色活力没有明显的抑制作用。

2.2.2 Vc 对脱色酶活性的影响:测定不同浓度自由基清除剂 Vc 对 TpmD 脱色酶活力影响,结果如图 1 所示。从测定结果可以看出,5.0mmol/L 以下的 Vc 对 TpmD 脱色活性的抑制作用相对较弱,超过 7.5mmol/L 后 Vc 对 TpmD 的抑制作用明显。当 Vc 的浓度达到 15.0mmol/L 时 TpmD 的脱色活性几乎被完全抑制。作为一种有效的抗氧化剂,Vc 的作用机理是清除自由基。Vc 对 TpmD 脱色活性抑制作用十分明显,表明该酶催化的脱色过程可能有自由基的参与。

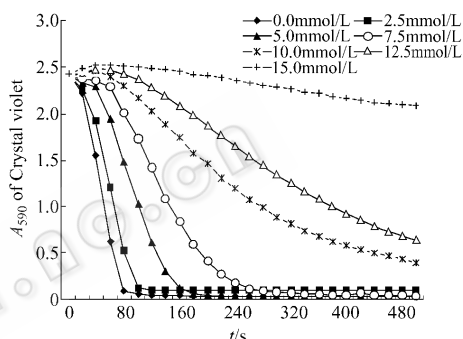


图 1 不同浓度的 Vc 对 TpmD 脱色活性的影响

Fig.1 The effect of different concentration of Vc on the activity of TpmD.

2.2.3 甲吡酮对脱色酶活性的影响:甲吡酮对脱色酶活力的影响测定结果如图 2 所示。从图中可以看出,2.0mmol/L 的甲吡酮即显示出对 TpmD 的抑制作用。并且随着甲吡酮浓度的升高其抑制作用逐渐加强。当甲吡酮浓度达到 10.0mmol/L 时抑制作用已十分明显。甲吡酮是一种细胞色素 P450 的特异性抑制剂,TpmD 对甲吡酮的抑制作用敏感,显示该酶可能属于与细胞色素 P450 相关的氧化酶类。

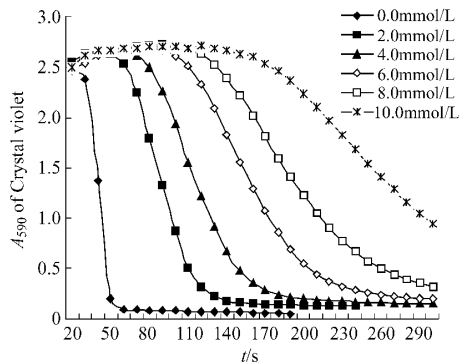


图 2 不同浓度的甲吡酮对 TpmD 脱色活性的影响

Fig.2 The effect of different concentration of metyrapone on the activity of TpmD.

2.3 酶蛋白的吸收光谱测定与分析

在测得 TpmD 对甲吡酮的抑制作用敏感之后,为进一步

研究该酶是否属细胞色素 P450 单加氧酶家簇中的一员,又测定了该酶在被连二亚硫酸钠还原条件下通 CO 气体后吸收光谱的迁移特征,结果如图 3 所示。由图可以看出,连二亚硫酸钠还原后该酶蛋白在 408nm 处的特征吸收峰迁至 418nm。通入 CO 气体后 418nm 处的特征吸收峰没有向 450nm 处迁移,而是发生蓝移,即向左迁移至 413nm 处。同时另外两处 522nm 及 555nm 的吸收峰变弱。还原条件下的酶蛋白通入 CO 气体后在 450nm 处并无细胞色素 P450 氧化酶特征吸收峰出现。这一结果表明该酶是一种与典型细胞色素 P450 氧化酶不同的氧化酶。

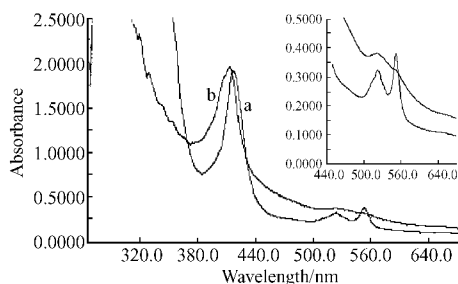


图 3 TpmD 的特征吸收峰及在还原条件下的酶蛋白通入 CO 气体后的迁移情况

Fig. 3 The spectra of TpmD enzyme protein solution. (a) the spectrum of TpmD in dithionite (DTN)-reduced enzyme solution (b) the spectrum shift induced on the binding of CO in sodium dithionite (DTN)-reduced enzyme solution. The insert figure was the spectra amplified between 440nm ~ 640nm.

2.4 TpmD 的 N-末端部分氨基酸序列及其对蛋白质序列数据库的相似性检索

纯化后的 TpmD 酶蛋白经 SDS-PAGE 检测为一条带,在测序仪上从 N-末端测几个循环后,未出现多头现象,说明蛋白纯度已达要求。为了结果更加精确,仍然采用 PVDF 印迹膜测序技术,成功地测定了 N-末端的 15 个氨基酸序列为:Ser-Ile-Ala-Val-Thr-Gly-Gly-Thr-Gly-Pro-Leu-Gly-Gly-Leu-Val。

测得 TpmD 的 N-末端部分氨基酸序列后,为判定 *Aeromonas hydrophila* DN322 产生的 TpmD 蛋白是否是一种新蛋白,以 N-末端 15 个氨基酸的序列片段为靶序列,在 NCBI 上采用 BlastP 程序进行序列对蛋白质序列数据库 (Non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + Spupdate + PIR) 的相似性检索,从中共检索出 5 条有同源性的序列(略)。这些序列分别是来源于 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 的短链脱氢酶、来源于 *Yersinia pestis* KIM 的氧化还原酶、来源于 *Chlamydomonas abortus* 的 NADP-依赖的苹果酸脱氢酶、来源于 *Nocardia farcinica* 与 *Chlamydia trachomatis* 的苹果酸脱氢酶、来源于 *Rhodococcus opacus* 的 NADPH-依赖的 F420 氧化还原酶等。TpmD 的 N-末端部分氨基酸序列相似性检索结果进一步证明该酶是一种氧化酶。

3 讨论

环境中残余染料污染的日益严重,使得人们不断寻找更为有效的染料降解方法。利用固定化脱色酶对污染环境中

的染料残余进行生物整治是一条低能耗、高效率的新方法^[6]。而利用类似的固定化酶技术处理使用量仅次于偶氮染料的三苯基甲烷类染料,目前在工程化应用上还是空白。其中一个主要原因是关于三苯基甲烷类染料脱色酶的研究目前为止仍然不够深入。因此开展相关脱色酶的研究显得十分迫切。

甲吡酮是一种细胞色素 P450 氧化酶的特异性抑制剂, Jone 及 Cha 在分别用 *Mycobacteria* 与 *Cunninghamella elegans* 的细胞对孔雀绿进行脱色研究时,发现两种菌的脱色活性受甲吡酮抑制,故此推测这两种菌的脱色过程可能有细胞色素 P450 的参与^[7,9]。本研究中我们用纯化的脱色酶 TpmD 对孔雀绿、结晶紫等四种三苯基甲烷染料进行脱色时,也同样发现了类似的甲吡酮抑制现象。因此初步推测 TpmD 是一种与细胞色素 P450 相关的氧化酶。而在被连二亚硫酸钠还原的条件下通入 CO 后,该酶在 418nm 处的特征吸收峰没有向 450nm 处迁移却向相反的方向迁移至 413nm,在 450nm 处无细胞色素 P450 氧化酶的特征吸收峰出现。就光谱吸收特征而言,该酶与典型的 P450 氧化酶存在着明显差异。巴西的学者 Thomaz 在研究来自啮齿类动物老鼠、巴西鱼 *Brycon cephalus* 及蟾蜍的肝脏微粒体细胞色素 P450 时,也观察到了类似的特征光谱迁移情况(由 421nm 迁移至 419nm)。作者进一步研究发现这是一类新的含血红素的蛋白(new hemoprotein, NHP),在一定条件下这些蛋白能够完全代替微粒体中细胞色素 P450 的功能,而吸收光谱却与典型 P450 存在明显差异^[22]。这些结果显示 TpmD 是一种新的氧化酶。有关该酶催化三苯基甲烷类染料脱色的酶学机理及编码酶蛋白的基因克隆尚在研究之中。

参 考 文 献

- [1] Azmi W, Sani RK, Banerjer UC. Biodegradation of triphenylmethane dyes. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **22**: 185 - 191.
- [2] Au W, Pathak S, Collie CI, et al. Cytogenic toxicity of gentian violet (crystal violet) on mammalian cells in vitro. *Mutat Res*, 1978, **58**: 269 - 276.
- [3] 肖乐,李振龙. 关注“孔雀石绿”. *中国水产*, 2005, **8**: 6 - 11.
- [4] 赵晓飞. 食品安全年,从“苏丹红事件”说起. *市场研究*, 2005, **6**: 62 - 64.
- [5] Abadulla E, Robra KH, Gubitz G, et al. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents. *Textile Res J*, 2000, **70**: 409 - 414.
- [6] Bumpus JA, Brock BJ. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(5): 1143 - 1150.
- [7] Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9): 4358 - 4360.
- [8] Kwasniewska K. Biodegradation of crystal violet (hexamethyl-rosaniline chloride) by oxidative red yeasts. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1985, **34**: 323 - 330.

- [9] Jone JJ, Falkinham III JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 2323 – 2326.
- [10] Gill PK, Arora DS, Chander M. Biodecolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, **28**: 201 – 203.
- [11] Rajesh KS, Uttam CB. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**: 433 – 437.
- [12] Sarnaik S, Kanekar P. Biodegradation of methyl violet by *Pseudomonas mendocina* MCM B-402. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 251 – 254.
- [13] Vasdev K, Kuhad RC, Saxena RK. Decolorization of triphenylmethane dyes by the birds nest fungus *Cyathus bulleri*. *Curr Microbiol*, 1995, **30**: 269 – 272.
- [14] Yatome C, Yamada S, Ogawa T, *et al.* Degradation of Crystal Violet by *Nocardia corollina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **38**: 565 – 569.
- [15] Yatome C, Ogawa T, Matsui M. Degradation of Crystal Violet by *Bacillus subtilis*. *J Environ Sci Health*, 1991, **A26**: 75 – 87.
- [16] Yesilada O. Decolourization of Crystal Violet by fungi. *World J Microbiol Biotechnol*, 1995, **11**: 601 – 602.
- [17] Mo On-sun J, Yong-Mi L, Yong-Lark C, *et al.* Isolation of *Citrobacter* sp. mutants defective in decolorizing malachite green. *J Basic Microbiol*, 2004, **44**(4): 320 – 324.
- [18] Henderson AL, Schmitt TC, Heinze TM, *et al.* Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4099 – 4101.
- [19] 任随周, 郭俊, 王亚丽, 等. 细菌脱色酶 TpmD 对三苯基甲烷类染料脱色的酶学特性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(3): 385 – 389.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248 – 254.
- [21] 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进. *工业卫生与职业病*, 1997, **4**: 236 – 238.
- [22] Thomaz AA, Silva Rocha-e, Farley B, *et al.* Spectral characteristics of a compound altering cytochrome P450 spectra from vertebrate microsomes suggest that it is a functional protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2001, **130**: 53 – 66.

Properties of a triphenylmethane dyes decolorization enzyme (TpmD) from *Aeromonas hydrophila* strain DN322

REN Sui-zhou, GUO Jun, CEN Ying-hua, SUN Guo-ping*

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

Abstract : A novel bacterial enzyme for decolorization of triphenylmethane dyes from *Aeromonas hydrophila* strain DN322 was purified and named TpmD. The basic properties of this enzyme including molecular weight, isoelectric point K_m as well as the optimum temperature and pH were determined and the enzyme was identified as an NADH/NADPH-dependent oxygenase in previous research. Based on previous results, the effect of different inhibitor including Vc, metyrapone, rotenone, antimycin A and NaN_3 as well as the effect of FAD and FMN on the activity of TpmD were measured. The results indicated that the activity of the decolorization enzyme was inhibited by Vc and metyrapone in a concentration-dependent manner, but wasn't inhibited by rotenone, antimycin A and NaN_3 . The activity of the decolorization enzyme was not enhanced by addition of FAD or FMN. The solution of the enzyme protein displayed only a single peak at 408nm in the Soret region, a characteristic peak of porphyrin, but did not show the characteristic peak of the cytochrome P450 proteins at 450nm in sodium dithionite(DTN)-reduced enzyme solution after treatment with carbon monoxide. The amino acid sequence of N-terminal of TpmD provided further evidence that the enzyme is an oxygenase. All these results suggest that decolorization enzyme TpmD is a new hemo-containing oxygenase. The decolorization enzyme would be a good material for further research of the enzymological mechanism of triphenylmethane dyes decolorization by bacteria.

Keywords : Decolorization enzyme ; *Aeromonas hydrophila* ; Enzymological properties

Foundation item : National Programs for High Research and Development of China (2003AA214040).

* Corresponding author. Tel : 86-20-87684471 ; Fax : 86-20-87684587 ; E-mail : ebiotech@gdas.ac.cn and guopingsun@163.com

Received : 7 November 2005 / Accepted : 1 December 2005 / Revised : 19 April 2006